

CITRIC ACID BIOTECHNOLOGY

柠檬酸生物工艺学

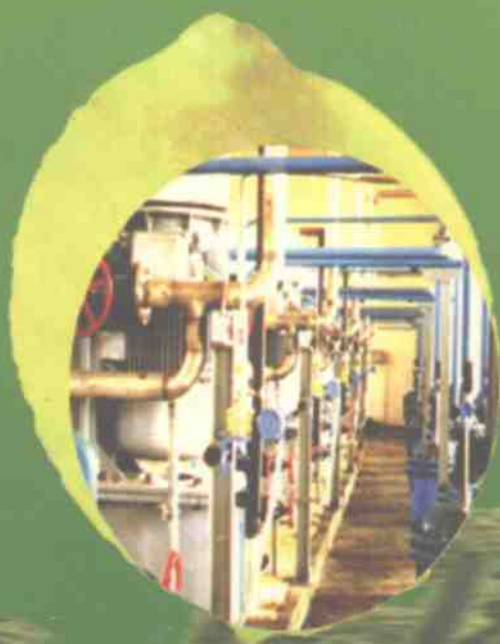
BJØRN KRISTIANSEN

MICHAEL MATTEY

JOAN LINDEN

编著

张洪勋 陈景韩 齐鸿雁 杨建州 等译校



中国科学技术出版社

CITRIC ACID BIOTECHNOLOGY

柠檬酸生物工艺学

BJØRN KRISTIANSEN

MICHAEL MATTEY

JOAN LINDEN

编著

张洪勋 陈景韩 齐鸿雁 杨建州 等译校

中国科学技术出版社

• 北 京 •

图书在版编目(CIP)数据

柠檬酸生物工艺学/张洪勋等译.——北京:中国科学技术出版社, 2001.10

ISBN 7-5046-3096-9

I. 柠… 张… II. 柠檬酸——发酵——工艺学 III. TQ921

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 033471 号
图字: 01-2001-2740 号

中国科学技术出版社出版

北京海淀区中关村南大街 16 号 邮政编码: 100081

电话: 62179148 62173865

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

北京印刷学院实习工厂

*

开本: 850 毫米×1168 毫米 1/32 印张: 9.75 字数: 250 千字

2001 年 10 月第 1 版, 2001 年 10 月第 1 次印刷

印数: 1—1000 册 定价: 30.00 元

(凡购买本社的图书, 如有缺页、倒页、
脱页者, 本社发行部负责调换)

欲购此书者, 请与中科院生态中心环境生物技术室联系: 6284-9155/915

感谢泰勒 (Taylor) 和弗朗西斯 (Francis)

出版公司提供版权

CITRIC ACID BIOTECHNOLOGY

Copyright © Taylor & Francis 1999

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, electrostatic, magnetic tape, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of the copyright owner.

版权所有：未经版权拥有者——Taylor & Francis 公司同意，本书任何内容不得复制及在检索系统保存，或以任何形式或手段如电子、静电、磁带、机械、影印、录音及其他任何方式传播本书任何内容。

责任编辑：任杏华
责任印刷：王 沛

英文版简介

柠檬酸生物技术是工业和学术界都感兴趣的领域。长期以来，柠檬酸生产是发展工业生物技术并促使新老技术交接的驱动力之一。今天，柠檬酸生物工艺不仅对于工业和经济展示了其重要性，而且也被用于在高等学校阐述生物工艺学原理的例子。

本书涵盖了广泛的生物工艺学内容，包括霉菌学、氧化还原反应、质能平衡、下游提取工艺、发酵底物和工厂设计。撰写本书的所有作者都具有工业经验和学术背景，他们已经或仍然工作在这个领域。

学习工业微生物、生物工艺学或生化工程的本科生和研究生以及有志于献身生物技术工业的人们将发现此书是一本内容广博、易于理解的权威性著作。本书还提供给研究工作者和企业管理人员诸多有价值的参考文献。

Bjørn Kristiansen 是一位具有丰富工作经验和学术造诣的生化工程师，是国内和国际生物反应器设计和操作方面的委员会成员，他的研究工作涉及柠檬酸发酵的许多方面。

Micheal Matthey 是一位生物化学家，所从事的工作关系到工业和学术上生物工艺的许多方面，从事柠檬酸工业工作已20年以上，主要在产柠檬酸微生物的生理学方面。

Joan Linden 是一位有经验的微生物学家，曾在柠檬酸生物工艺方面工作多年，目前她在挪威从事英语教学工作。

译 序

这是一本关于柠檬酸生物技术方面的专著,于 1999 年由泰勒和弗朗修斯出版社出版。

本书由 3 位在柠檬酸生物技术方面资深作者所编著,内容涉及柠檬酸发酵的生物化学、微生物菌种、发酵过程参量变化、产品提取技术以及工厂设计、建设等诸多方面。书中引用文献极为丰富,很多资料是 20 世纪 90 年代以来的研究成果,基本反映了当今柠檬酸研究现状。

本书可供从事柠檬酸技术研究者、企业技术人员、管理人员和相关领域的科技工作者参考。

参加本书译校工作的其他人员如下(按姓氏笔画排列):白志辉、齐鸿雁、庄续亮、刘德明、余志晟、杨建州、杨守志、张松鹏、顾红燕、鲁治滨、雷志芳。

由于译校人员水平有限,书中难免有不当之处,恳请读者批评指正。

张洪勋 陈景韩

本书著者

Ho Ai Meng Amy (新加坡)

Marin Berovic (斯洛文尼亚)

Pawel Gluszcza (波兰)

Bjørn Kristiansen (挪威)

Liliana Krzystek (波兰)

Christian Kubicek (奥地利)

Stanisław Ledakowicz (波兰)

Władysław Lesniak (波兰)

Michael Matthey (英国)

Maria Papagianni (希腊)

George Ruijter (荷兰)

Jacobus van der Merwe (南非)

Jaap Visser (荷兰)

Frank Wayman (英国)

Markus Wolschek (奥地利)

目 录

1 柠檬酸生物工艺学简介	(1)
1.1 来自柠檬的柠檬酸	(1)
1.2 合成柠檬酸	(2)
1.3 微生物柠檬酸	(3)
1.4 表面发酵法生产柠檬酸	(5)
1.5 深层发酵工艺	(6)
1.6 连续和固定化工艺	(9)
1.7 酵母发酵工艺	(9)
1.8 制曲 (Koji) 工艺	(12)
1.9 柠檬酸用途	(12)
1.10 废物处理	(13)
1.11 结论	(14)
1.12 参考文献	(15)
2 黑曲霉积累柠檬酸的生物化学	(17)
2.1 引言	(17)
2.2 黑曲霉葡萄糖代谢及其调节	(18)
2.3 柠檬酸生物合成调节	(28)
2.4 柠檬酸积累过程中柠檬酸的降解作用	(31)
2.5 白黑曲霉细胞输出柠檬酸	(35)
2.6 参考文献	(37)
3 酵母生产柠檬酸的生物化学	(57)
3.1 引言	(57)
3.2 自正链烷合成柠檬酸	(60)

3.3	自葡萄糖合成柠檬酸之途径	(77)
3.4	结束语	(83)
3.5	参考文献	(84)
4	菌种改良	(96)
4.1	引言	(96)
4.2	菌种改良工作概况	(97)
4.3	用准性生殖从黑曲霉分离重组菌株	(104)
4.4	遗传工程	(105)
4.5	结束语	(112)
4.6	致谢	(112)
4.7	参考文献	(112)
5	真菌形态学	(121)
5.1	引言	(121)
5.2	深层发酵影响黑曲霉形态学的因素	(121)
5.3	搅拌的影响	(123)
5.4	营养因素的影响	(129)
5.5	接种量的影响	(140)
5.6	结论及展望	(141)
5.7	参考文献	(141)
6	柠檬酸深层发酵中的氧化还原电位	(147)
6.1	引言	(148)
6.2	概述	(149)
6.3	原理	(150)
6.4	氧化还原电位的测量	(152)
6.5	氧化还原电位的重要性	(154)

6.6	柠檬酸发酵过程中的氧化还原电位	(156)
6.7	氧化还原电位的调节	(162)
6.8	柠檬酸发酵过程中氧化还原电位的调节	(163)
6.9	根据氧化还原电位进行规模放大	(169)
6.10	结论	(171)
6.11	参考文献	(172)
7	柠檬酸发酵过程的数学模型	(177)
7.1	引言	(177)
7.2	曲霉发酵模型	(180)
7.3	酵母发酵模型	(187)
7.4	结论	(195)
7.5	参考文献	(195)
8	质能平衡	(198)
8.1	引言	(200)
8.2	黑曲霉生长代谢描述	(200)
8.3	质能平衡	(205)
8.4	黑曲霉生长及其生产柠檬酸的动力学特性	(209)
8.5	碳平衡和可用电子平衡	(213)
8.6	结论	(216)
8.7	参考文献	(217)
9	柠檬酸生产下游工艺	(219)
9.1	发酵醪液预处理	(219)
9.2	沉淀法	(220)
9.3	溶剂萃取	(226)
9.4	吸附、吸收和离子交换	(228)

9.5	液膜	(230)
9.6	电渗析	(231)
9.7	超滤	(233)
9.8	微生物固定化	(233)
9.9	参考文献	(234)
10	发酵原料	(241)
10.1	引言	(241)
10.2	糖蜜	(243)
10.3	精制蔗糖或粗蔗糖	(252)
10.4	糖浆	(253)
10.5	淀粉	(253)
10.6	葡萄糖糖蜜	(254)
10.7	烷烃类	(254)
10.8	油和脂肪	(255)
10.9	纤维素	(256)
10.10	其他培养基成分	(256)
10.11	结论	(257)
10.12	参考文献	(257)
11	工厂设计	(260)
11.1	工厂设计	(263)
11.2	要求的数据	(264)
11.3	基础设计	(266)
11.4	工作域确定	(268)
11.5	项目程序包	(268)
11.6	原料	(270)
11.7	培养基制备	(270)

11.8	发酵	(271)
11.9	搅拌式反应器的设计	(273)
11.10	气升式反应器和鼓泡式反应器	(277)
11.11	产品分离	(281)
11.12	菌体分离	(281)
11.13	纯化	(283)
11.14	结晶步骤	(289)
11.15	产品包装	(290)
11.16	废弃物与副产物	(291)
11.17	结论	(291)
11.18	参考文献	(292)

柠檬酸生物工艺学简介

MICHAEL MATTEY BJØRN KRISTIANSEN

1.1 来自柠檬的柠檬酸

“他们被挤压，像管子中柠檬那样被挤压至发出吱吱声，我怀疑的不是我们拥有的挤压能量，而是是否还有果汁存在” (Sir Eric Geddes, 1918)

Sir Eric Geddes 的上述著名言论用来描绘那个年代的柠檬酸工业状况仅仅是巧合，事实上，那个年代真菌发酵工业化生产柠檬酸的发展避免了柠檬汁价格高涨和柠檬汁供应不足问题。把税制与挤压柠檬联系起来是适当的，因为柠檬酸的历史反映了那个年代的政治、经济和科学状况。柠檬酸生产的确是“古典”生物技术现象，那时的科学虽说是重要，但对于政治与经济来说是第二位的。本书试图反映与柠檬酸相关的应用科学、基础理论知识和经济之间的平衡发展。

柠檬酸一词来源于拉丁文 *citrus*，枸橼树，它的果实像柠檬。柠檬酸最先由瑞典化学家 Carl Scheele 1784 年从柠檬汁中分离到，他在化学工业上有很多重要发现，其中有氢氟酸、酒石酸、亚砷酸、辉铜矿、乳酸、柠檬酸、马来酸、草酸、没食子酸和其他酸以及氯、氧（氯和氧，1772，1780 年以英文发表，比 Priestly 在 1774 年的发现要早），还有甘油和硫化氢。柠檬酸

只是许多天然有机酸之一而已。

大约在1826年，英国的 John 和 Edmund Strurge 以意大利柠檬为原料进行了柠檬酸商业化生产，但随着柠檬酸商品的重要性日益提高，意大利的柠檬种植者则开始了柠檬酸的工业化大生产。在那以后的19世纪，他们实际上垄断了柠檬酸行业。直到1919年在比利时建立第一家黑曲霉发酵生产柠檬酸工厂之前，柠檬汁一直是柠檬酸的生产原料。

柠檬汁本身就是一种重要产品。世界柠檬平均年产量约330万t（来自美国对外国农业统计），大约75%的产量来自美国、意大利、西班牙和阿根廷，其余产量来自大约其他15个国家。

欧洲和美国的柠檬市场化受政治支配。在欧洲，柠檬汁加工业有政府补贴，这使得加工业比出售新鲜产品更具商业吸引力。此外，欧洲的干预机制导致相当数量的柠檬遭到破坏。在美国，市场化由美国农业部（USDA）柠檬管理委员会控制，该委员会决定多少柠檬应进入新市场出售和出售柠檬到哪些成长的领域。

任何经济垄断的结果都导致产品价格昂贵。没有竞争机制激励，成本控制、工艺发展和生产效率提高就会被忽略。19世纪的柠檬酸也不例外：意大利的垄断导致柠檬酸价格居高不下，从而诱使那个时代的企业家寻找生产日渐增值的产品的替代资源。由于不能够找到柠檬酸的替代植物资源，19世纪的化学和微生物学成就必须加以利用。世纪轮回，证明化学和微生物法获取柠檬酸两种可能性都存在。

1.2 合成柠檬酸

Grimoux 和 Adams（1880）自丙三醇合成了柠檬酸，后来

又以对称的二氯丙酮（化合物1）合成了柠檬酸。二氯丙酮经氰化氢处理得到二氯丙酮酸（化合物2）；二氯丙酮酸再同氰化钾反应生成二氰基丙酮酸（化合物3）；然后水解二氰基丙酮酸生成柠檬酸（化合物4），反应过程如图1.1所示。

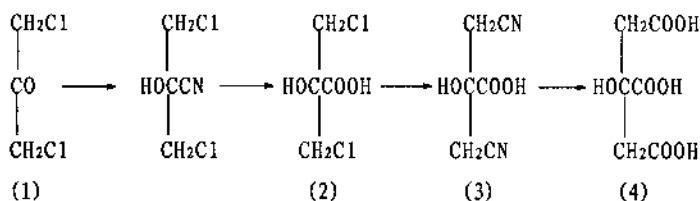


图 1.1 有机合成柠檬酸

自上述合成路线发表之后，以其他起始原料合成柠檬酸的路线也相继报道。然而，迄今为止已证明所有的化学方法从经济原因考虑都是无竞争力的。起始原料价格比终产物还要贵，因合成反应步骤多造成产率低以及合成过程中产生和使用的有毒化合物的问题都是化学合成无法解决的。

1.3 微生物柠檬酸

通过微生物的作用而产生有价值化合物的概念源于早期巴斯德对于发酵的研究，之后在他的开创性工作引导下，开展了对真菌和细菌的系统研究。在这些早期工作中，Wehner 于1893年表明他所称的“柠檬霉菌”（现在证实为青霉）能在含有糖和无机盐的培养基中积累柠檬酸。这项工作并没有直接引向商业开发，但后来对其他能够合成柠檬酸的微生物的研究做到了这一点。已发

现的许多其他能够积累柠檬酸的微生物的菌种包括：

- 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)
- 泡盛曲霉 (*A. awamori*)
- 琉球曲霉 (*A. luchensis*)
- 海枣曲霉 (*A. phoenicis*)
- 文氏曲霉 (*A. wentii*)
- 海枣曲霉 (*A. saitoi*)
- 黄曲霉 (*A. flavus*)
- 梨头霉属种 (*Absidia* sp.)
- 支顶孢属种 (*Acremonium* sp.)
- 葡萄孢霉属种 (*Botrytis* sp.)
- 青霉属种 (*Eupenicillium* sp.)
- 梨形毛霉 (*Mucor piriformis*)
- 微紫青霉 (*Penicillium janthinellum*)
- 局限青霉 (*P. restrictum*)
- 裸节菌属种 (*Talaromyces* sp.)
- 绿色木霉 (*Trichoderma viride*)
- 译名待定 (*Ustulina vulgaris*)
- 译名待定 (*A. fonsecaeus*)
- 译名待定 (*A. lanosius*)
- 译名待定 (*Aschochyta* sp.)

Currie (1917) 发现黑曲霉在低 pH 值、含有无机盐和高糖的培养基中产生柠檬酸，已知此黑曲霉株先前产草酸，而现在产柠檬酸，关键差别是低pH值培养基。如人们现在所知，低pH值可抑制草酸和葡萄糖酸产生，草酸有碍柠檬酸生成，而葡萄糖酸比柠檬酸的产率高。Currie 后来加入了Chas. Pfizer 公司，他的发现